

## 植物細胞培養による効率的な代謝物生産プロセスの構築に関する研究

著者	飯塚 泰弘
号	3392
発行年	2004
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/8664">http://hdl.handle.net/10097/8664</a>

氏 名	飯塚 泰弘 <small>いづか やすひろ</small>		
授 与 学 位	博士 (工学)		
学 位 授 与 年 月 日	平成 17 年 3 月 25 日		
学位授与の根拠法規	学位規則第 4 条第 1 項		
研究科、専攻の名称	東北大学大学院工学研究科 (博士課程) 化学工学専攻		
学 位 論 文 題 目	植物細胞培養による効率的な代謝物生産プロセスの構築に関する研究		
指 導 教 官	東北大学教授 米本 年邦		
論 文 審 査 委 員	主査	東北大学教授 米本 年邦	東北大学教授 松本 繁
		東北大学教授 猪股 宏	

## 論文内容要旨

植物細胞培養技術は、医薬品や染料などの原料となる植物由来の有用代謝物を工業的に生産するための手法として注目されている。しかし、生産コストが高いため、実用化に到った例は数少ない。経済性の高い効率的な代謝物生産プロセスを構築するためには、培養時間や体積あたりの生産量の増大や連続生産プロセスの構築が必要となる。また、培養槽内における細胞増殖や代謝物生産などの生物現象の予測、および培養プロセスの制御や最適化も重要であり、そのためには、細胞増殖や代謝物生産を表現できる速度論モデルの構築が有効である。植物の代謝物には細胞外に放出されるものと細胞内に蓄積されるものの 2 つのタイプが存在し、前者では、細胞と培地の分離や培地中の代謝物の選択的な回収を行うことにより、目的代謝物の連続生産プロセスの構築が可能となる。

本研究では、代謝物が細胞外に放出される系として、タバコ細胞によるフェノール類およびスコポレチンの生産を取り上げ、まず細胞と培地の分離技術の一つである固定化培養法に関する検討を行う。そして、この固定化培養法を代謝物の選択的な回収を可能とする抽出溶媒添加法と組み合わせることにより、目的代謝物の連続生産プロセスを構築する。また、代謝物が細胞内に蓄積される系として、チャ細胞によるフラボノイド生産を取り上げ、生産性向上を目的として、フラボノイド生産に及ぼす培養条件の影響を実験的に検討すると共に、その生産挙動を表現できる速度論モデルを構築し、最適培養条件を探索する。

### 第 1 章 緒論

植物細胞培養による代謝物生産の有用性と問題点を述べるとともに、代謝物生産性の向上に関する研究の現状を紹介した。また、本研究の目的および概要を述べた。

### 第 2 章 アルギン酸カルシウムゲルビーズを担体とした固定化タバコ細胞培養

固定化培養法は、細胞と培地の分離が容易である、細胞の繰り返しや連続利用が可能である、流体剪断力や外的環境の変化から細胞を保護できるなどの利点を有する。しかし、一般的な植物細胞の固定化法であるアルギン酸カルシウムゲルによる包括法では、培養の経過に伴いゲル内から培地中への細胞漏出が観察され、前述した利点が失われることが多い。従って、固定化培養において、この細胞漏出を防ぐことは重要である。

本章では、従来のアルギン酸カルシウムゲルの単層ビーズを担体とした固定化タバコ細胞培養を行い、ビーズ内細胞増殖および培地中への細胞漏出に及ぼす固定化条件の影響を検討した。その結果、ゲルビーズの  $\text{Ca}^{2+}$  によるアルギン酸鎖の架橋度を増加させることにより、細胞漏出の防止効果が大きくなるが、ビーズ内の細胞増殖の抑制効果も大きくなることを明らかにした。また、培養の経過に伴うゲルビーズの架橋度の低下を防ぐために、培地中に  $\text{CaCl}_2$  を添加した条件で固定化培養を行い、その添加濃度の影響を検討した。そして、培地中への  $\text{CaCl}_2$  添加量を増大させると、培養の経過に伴うビーズ内の  $\text{Ca}^{2+}$  の溶出を防ぐことができ、架橋度の低下が抑制され、細胞漏出の防止効果が大きくなることを明らかにした。以上の検討により、細胞漏出を防止するためにはゲルビーズの架橋度を増加させること、および培養期間中、その架橋度を維持することが重要であることが分かった。しかし、架橋度を高くし過ぎたり、培地に添加する  $\text{CaCl}_2$  濃度が高すぎると、ビーズ内細胞増殖が抑制されるため、本固定化タバコ細胞培養では増殖を良好に維持でき、かつ細胞漏出量が小さい適切な架橋度や  $\text{CaCl}_2$  の添加濃度が存在すると考えられる。

### 第3章 コーティングゲルビーズを担体とした固定化タバコ細胞培養によるフェノール類の生産

第2章で提案した適切な架橋度や  $\text{CaCl}_2$  添加濃度においても、培養終了時の20日目には僅かながら培地中への細胞漏出が観察された。従って、従来の単層ビーズによる固定化法を長期間の培養を行うことが重要である連続生産プロセスに適用することは困難であり、細胞漏出を完全に防止可能な新規な固定化法の開発が望まれる。

本章では、従来のアルギン酸カルシウムゲルの単層ビーズの周囲を細胞を含まない同ゲルの薄層でコーティングするという新規な固定化法を提案し、タバコ細胞培養においてコーティング層厚さの影響を検討した。その結果、ビーズ内細胞増殖を良好に保ちつつ、培地中への細胞漏出を完全に防止するための最適なコーティング層厚さ（本タバコ細胞では0.42 mm程度）が存在することを明らかにした。また、コーティング層厚さ0.42 mmの固定化培養において、代謝物の一つであるフェノール類の生産挙動を懸濁培養系と比較したところ、アルギン酸カルシウムゲルのコーティングビーズ内への細胞固定化により、フェノール類の生産および培地中への放出が促進されることが分かった。さらに、一般的な細胞培養用のエアリフト型リアクターを用いてコーティング厚さ0.42 mmのビーズの培養を行った。その結果、コーティングビーズによる細胞固定化法は、流体剪断力が比較的大きなエアリフト型リアクターでの25日間の培養においても、細胞漏出を完全に防ぐことができ、かつビーズ内の細胞増殖やフェノール類の生産が良好であることを明らかにした。

### 第4章 固定化タバコ細胞培養と抽出溶媒添加の組み合わせによるスコボレチン生産

植物細胞培養による代謝物の生産性を高めるための一方策として、培養系に目的代謝物を溶解する抽出溶媒を添加する手法が報告されている。しかし、溶媒添加による細胞へのストレスが大きいなどの問題点がある。一方、第2、第3章で検討を行った細胞固定化法は、細胞と培地を容易に分離できだけでなく、外的環境の変化から細胞を保護できるという利点も有している。そこで、第3章で提案したアルギン酸カルシウムゲルのコーティングビーズによる固定化法と抽出溶媒添加法を組み合わせることにより、溶媒添加による細胞へのストレスを軽減させ、かつ目的代謝物を選択的に連続生産できるプロセスの構築が可能となると考えられる。

本章では、種々の生理活性を有するスコボレチンの生産を目的としたタバコ細胞培養において、まず本培養系に適した抽出溶媒種を選択するために、分配実験を行うと共に、細胞生存率に及ぼす溶媒添加の影響を検討した。その結果、分配係数が高く細胞生存率の低下を伴わない溶媒としてココナッツオイルを選択した。次に、この溶媒添加と、第3章で提案したコーティングビーズによる細胞固定化法の組み合わせ回分培養を行い、溶媒添加量の検討を行った。そして、本系では、生存率の低下を伴わずに溶

媒添加量を増加することができ、この添加量の増加に伴い培地相から溶媒相へのスコポレチンの移動量が多くなり、総生産量が著しく増大することを明らかにした。さらに、溶媒の連続的な供給および回収を行う培養システムを構築し、スコポレチンの連続生産を行った。その結果、本システムでは、生産物阻害を伴わない連続的なスコポレチン生産を行うことができ、細胞あたりのスコポレチン生産量は、流量を  $100 \text{ cm}^3/\text{day}$  とした場合、30 日間で  $2.21 \text{ mg/gDCW}$  となり、溶媒の供給と回収を行わない回分固定化培養の 2.4 倍、抽出溶媒を添加しない回分懸濁培養の 37 倍と飛躍的に増大した。

## 第 5 章 懸濁チャ細胞培養におけるフラボノイド生産に及ぼす光照射条件の影響

茶が代謝物として合成するフラボノイドは、その 80-95 % がカテキンであり、このカテキンは抗酸化、抗菌作用を有する有用物質として注目されている。チャ細胞によるフラボノイド生産に関する研究では、細胞増殖が遅く、含有量も親植物よりも著しく低いのが通例であった。このため、生産性を向上させるためには、細胞の増殖能や代謝物生産能を高めることが重要である。

本章では、フラボノイド生産を目的とした懸濁チャ細胞培養において、細胞増殖およびフラボノイド生産に及ぼす照射光強度の影響を検討した。その結果、光強度の増加に伴い細胞増殖が抑制される一方で、フラボノイド生産が促進されることが分かった。また、光照射により代謝の鍵酵素である *Phenylalanine ammonia lyase* (PAL) の活性が増大しており、このことがフラボノイド生産の促進に関与していると考えられる。さらに、3000 lux の光照射下で数世代に渡る繰り返し培養を行ったところ、光照射による細胞増殖の抑制が解消されると共に、細胞内フラボノイド含有量が  $142\text{--}152 \text{ mg/gDCW}$  と親植物で最も高い葉の値と同程度まで高まり、培地あたりの生産性が暗黒下の約 4 倍と向上した。この繰り返し培養によって葉への分化が進行していることが観察され、このことがフラボノイド生産の促進の一因となっていると考えられる。また、この繰り返し培養で得られた細胞が生産するフラボノイド中のカテキン類の割合は茶植物と同程度であることを明らかにした。

## 第 6 章 懸濁チャ細胞培養におけるフラボノイド生産に関する速度論モデル

植物細胞培養による代謝物生産性を向上させるためには、培養槽内における細胞増殖や代謝物生産に及ぼす操作因子の影響を定量的に表現できる速度論モデルの構築が有効である。これまでに細胞増殖に関しては、生物現象を考慮した詳細な速度論モデルが提案されている。一方、代謝物生産に関しては、経験的な Leudking-Piret 式が適用されているにすぎず、詳細な代謝機構を考慮したモデルの構築が望まれる。

本章では、懸濁チャ細胞培養において、当研究室で以前に提案した細胞のライフサイクルを考えた上で、DNA の転写や mRNA の翻訳からなる PAL タンパク質の発現機構とその発現量に基づくフラボノイド生産を考慮することにより、種々の照射光強度下での細胞増殖およびフラボノイド生産を表現する速度論モデルを構築した。本モデルは、光強度の増加に伴い細胞濃度が緩やかに増加する様子やフラボノイド代謝の鍵酵素である PAL 活性が大きくなり、それに伴いフラボノイド含有量が増大する様子を良好に表現できた。得られたモデル定数値に関して、他の研究で報告された値や一般的な知見との比較により、その妥当性を示した。また、構築したモデルによるシミュレーションと実際の培養実験結果との比較により、本モデルで考慮した光強度に応じた増殖抑制や mRNA への転写促進とその翻訳による PAL の生成機構、PAL の自己分解が妥当であることを示した。さらに、このモデルを用いて、種々の照射光条件での培養体積あたりのフラボノイド生産量の経時変化をシミュレートしたところ、生産量の最大値 ( $0.84 \text{ g/dm}^3$ ) を得るためには 2000 lux の条件下で 28 日間程度培養を行うことが適切であることが予測された。

## 第 7 章 総括

前章までの内容を各章毎にまとめ、本論文を総括した。

# 論文審査結果の要旨

植物細胞培養技術は、植物由来の有用代謝物を工業的に生産するための手法として注目されている。しかし、生産コストが高いため、実用化に到った例は数少ない。効率的な代謝物生産を行うためには、培養時間や体積あたりの生産量の増大や連続生産プロセスの構築が必要となる。また、培養槽内における細胞増殖や代謝物生産などの生物現象の予測も重要であり、そのためには、これらを表現できる速度論モデルの構築が有効である。

著者は、代謝物が細胞外に放出される系としてタバコ細胞によるスコポレチン生産を取り上げ、まず、細胞と培地の分離技術の一つである固定化培養法に関する検討を行った。次に、この固定化培養法を代謝物の選択的回収を可能とする抽出溶媒添加法と組み合わせることにより、目的代謝物の連続生産プロセスを構築した。また、代謝物が細胞内に蓄積される系としてチャ細胞によるフラボノイド生産を取り上げ、代謝物生産に及ぼす培養条件の影響を実験的に検討すると共に、生産挙動を表現できる速度論モデルの構築を行い、最適培養条件を探索した。本論文はこれらの成果を纏めたもので、全編7章からなる。

第1章は緒論である。

第2章では、従来のアルギン酸カルシウムゲルの単層ビーズを担体とした固定化タバコ細胞培養を行い、ゲルビーズの架橋度を増加させることにより、培地中への細胞漏出の防止効果が大きくなるが、ビーズ内の細胞増殖の抑制効果も大きくなることを明らかにした。

第3章では、従来の単層ビーズの周囲を細胞を含まない同ゲルの薄層でコーティングするという新規な細胞固定化法を提案し、タバコ細胞培養においてビーズ内細胞増殖を良好に保ちつつ、細胞漏出を完全に防止するための最適なコーティング層厚さを提言した。

第4章では、スコポレチン生産を目的としたタバコ細胞培養において、3章の細胞固定化法と本系に適した抽出溶媒(ココナッツオイル)の添加を組み合わせることにより、細胞増殖能を維持したまま溶媒添加量の増加が可能となり、代謝物生産量が著しく増大したことを明らかにした。また、溶媒の連続的な供給と回収を行う培養システムを構築し、連続的な代謝物生産が可能であることを示した。

第5章では、種々の光強度下で懸濁チャ細胞培養を行い、光強度の増加がフラボノイド含有量を増大させること、この含有量の増大には代謝の鍵酵素である *Phenylalanine ammonia-lyase* (PAL) 活性の向上が関与していることを明らかにした。

第6章では、懸濁チャ細胞培養において、細胞のライフサイクルおよびPALタンパク質の発現機構とその発現量に基づくフラボノイド生産を考慮することにより、種々の光強度下での細胞増殖およびフラボノイド生産を表現できる速度論モデルを構築した。このモデルを用いたシミュレーションにより、代謝物生産性が最大となる培養条件を探索した。

第7章は、本論文の総括である。

以上要するに本論文は、新規な細胞固定化法と天然オイルを抽出溶媒とした添加法を組み合わせた連続生産プロセスの構築や、細胞の増殖や代謝機構を考慮した速度論モデルを用いた適切な培養条件の探索により、効率的な代謝物生産を可能としたものであり、細胞培養工学および生物反応工学の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。